

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
16 janvier 2003 (16.01.2003)(10) Numéro de publication internationale  
PCT WO 03/004559 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C08K 9/08,  
C08F 2/44BIBETTE, Jérôme [FR/FR]; 16, rue Boulon, F-33000  
Bordeaux (FR). MONDAIN-MONVAL, Olivier [FR/FR];  
116, rue Brach, F-33000 Bordeaux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/01552

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;  
12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(22) Date de dépôt international : 6 mai 2002 (06.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

01/06203

10 mai 2001 (10.05.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy L'étoile (FR). CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel  
Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ELAIS-  
SARI, Abdelhamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod,  
F-69007 Lyon (FR). MONTAGNE, Franck [FR/FR];  
515, domaine du Bois Saint Paul, F-69390 Charly (FR).  
BOSC, Eric [FR/FR]; 34, chemin de Blanquette, F-33770  
Salles (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland  
Garros, F-69960 Corbas (FR). MANDRAND, Bernard  
[FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*(54) Title: COMPOSITE PARTICLES, DERIVED CONJUGATES, PREPARATION METHOD THEREOF AND APPLICA-  
TIONS OF SAME

(54) Titre : PARTICULES COMPOSITES, CONJUGUES DERIVES, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to composite particles comprising a hydrophobic polymer core and inorganic nanoparticles. Said hydrophobic polymer forms a polymer matrix inside which the inorganic nanoparticles are stabilised and distributed in a relatively homogenous manner. Said particles are at least partially surrounded by an amphiphilic copolymer comprising a hydrophobic part and a hydrophilic part, said hydrophobic part being at least partially immobilised in the polymer matrix. The invention also relates to the preparation method thereof, the conjugates comprising such particles and a ligand and the use of same in reactants and therapeutic compositions.

(57) Abrégé : Les particules composites de l'invention comprennent un c ur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules in-  
organiques, ledit polymère hydrophobe constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques  
sont stabilisées et distribuées de manière relativement homogène, lesdites particules étant au moins partiellement entourées par un  
copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiel-  
lement immobilisée dans ladite matrice polymère. L'invention concerne aussi leur procédé de préparation, ainsi que les conjugués  
comprenant de telles particules et un ligand, et l'utilisation de ceux-ci dans des réactifs et compositions thérapeutiques.

WO 03/004559 A1

Particules composites, conjugués dérivés, procédé de préparation et applications

La présente invention a pour objet des particules composites, leur  
5 procédé de préparation et leurs utilisations.

Les microsphères de type polymère présentent un intérêt comme support, vecteur ou véhicule dans les domaines de l'ingénierie biologique, du diagnostic et de la pharmacie. A cet effet, elles ont été utilisées dans le diagnostic médical comme support solide pour des molécules biologiques.

10 Les particules colloïdales présentent plusieurs avantages par rapport aux supports solides traditionnels, tels que tubes, plaques, billes, notamment parce qu'elles permettent de disposer d'une grande surface pour des interactions spécifiques et parce qu'elles sont facilement modifiables chimiquement pour introduire à leur surface des groupements fonctionnels  
15 susceptibles de réagir avec d'autres molécules, par exemple des molécules biologiques telles que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des protéines, des polypeptides, des polynucléotides, des acides nucléiques, des fragments d'acides nucléiques, des enzymes ou des molécules chimiques telles que des catalyseurs, des médicaments, des molécules cages, des  
20 chélatants.

Parmi les particules colloïdales, les latex magnétiques ont suscité un grand intérêt dans le domaine analytique et sont utilisés par exemple comme moyen pour séparer et/ou détecter des analytes, tels que des antigènes, des anticorps, des molécules biochimiques, des acides nucléiques  
25 et autres.

Les particules composites de type polymère/magnétique sont habituellement classées en trois catégories sur un critère de taille : les petites particules ayant un diamètre inférieur à 50 nm, les grosses particules ayant un diamètre supérieur à 2  $\mu$ m et les particules intermédiaires d'un diamètre  
30 compris entre 50 et 1000 nm.

Mais pour qu'elles puissent être considérées comme de bons candidats, en particulier pour une application diagnostique, elles doivent

répondre à certains critères. D'un point de vue morphologique, il est préférable qu'elles soient relativement sphériques et que la charge magnétique soit répartie de façon relativement homogène dans la matrice polymère. Elles ne doivent pas s'agréger de manière irréversible sous l'action d'un champ magnétique, ce qui signifie qu'elles puissent être redispersées facilement, rapidement et de manière réversible. De même, elles doivent présenter une densité relativement faible pour réduire le phénomène de sédimentation. Avantageusement, elles doivent présenter une distribution granulométrique étroite. On parle encore de particules monodisperses ou isodisperses.

10           Ainsi, en raison de leur taille et de leur densité, les grosses particules magnétiques en suspension dans une phase liquide ont tendance à rapidement sédimenter. Par ailleurs, elles tendent à s'agréger après avoir été soumises à un champ magnétique car elles sont susceptibles d'avoir été de ce fait magnétisées de manière permanente (aimantation rémanente). Elles ne  
15           constituent donc pas un bon candidat.

          A contrario, les petites particules magnétiques ont tendance à rester en suspension du fait de leur mouvement Brownien et sont difficilement attirées, voire pas du tout, par un aimant, en particulier si le champ magnétique appliqué est relativement faible. Elles ne sont donc pas bien appropriées pour  
20           les utilisations développées ci-dessus.

          Il existe donc un intérêt évident à produire des particules composites de type polymère/magnétique, présentant une taille intermédiaire entre 50 et 1000 nm, qui à la fois pallient les inconvénients précités et répondent aux critères établis ci-dessus. Mais l'invention n'est pas limitée à  
25           des particules composites magnétisables, comme décrit ci après.

          La demande de brevet EP-A-0 390 634 décrit des microsphères composites magnétisables de polymère vinylaromatique réticulé hydrophobe d'un diamètre de l'ordre de 50 à 10 000 nm et comprenant un cœur solide constitué de particules magnétisables et d'une écorce constituée d'un  
30           copolymère hydrophobe dérivé d'au moins un monomère vinylaromatique hydrophobe et d'au moins un polymère émulsifiant polyéthyléniquement insaturé soluble dans le ou les monomères vinylaromatiques et susceptible de

réticuler avec le ou lesdits monomères. Toutefois, bien qu'elles puissent répondre à l'exigence de la taille, elles présentent l'inconvénient de ne pas avoir une répartition homogène de la charge magnétique qui est localisée à l'intérieur du cœur. Par ailleurs, et comme cela ressort à l'évidence des figures annexées, les particules ne sont pas homogène en taille. Il s'agit donc d'un ensemble de particules polydisperses qui devront être triées par application d'un champ magnétique pour ne retenir que les particules de taille attendue.

On peut également citer les particules Dynal (nom commercial). Ces particules sont des microsphères constituées d'un cœur poreux de polystyrène et d'oxydes de fer, les oxydes de fer ayant été déposés par imprégnation au niveau des pores disponibles à la surface du polystyrène, et d'une enveloppe en un autre polymère qui encapsule les oxydes de fer des microsphères poreuses. Elles présentent un diamètre respectivement de 2,8  $\mu\text{m}$  (particules M280) et de 4,5  $\mu\text{m}$  (particules M450) et sont relativement uniformes en taille. Elles sont donc considérées comme des particules isodisperses mais en raison de leur taille élevée présentent les inconvénients précités, principalement le phénomène de sédimentation. De plus, leur surface spécifique est faible.

Le document US-A-4 358 388 décrit des particules composites constituées par une matrice polymère dans laquelle une charge magnétique est répartie de manière homogène. Elles sont obtenues par polymérisation d'un monomère organique insoluble dans l'eau, dans une phase organique contenant la charge magnétique, ladite phase organique étant en émulsion dans une phase aqueuse en présence d'un agent tensioactif.

De telles particules constituent en biologie des supports similaires à ceux évoqués précédemment du type tubes, plaques ou billes, avec un atout supplémentaire résidant dans leur capacité à être isolées facilement par l'application d'un champ magnétique.

5 Néanmoins, leur utilisation dans ce domaine d'application reste assez limitée car ces particules ne présentent aucune fonctionnalisation.

Selon l'invention on dispose maintenant de nouvelles particules composites qui apportent une solution aux problèmes posés par les particules connues précédemment décrites et qui répondent aux critères suivants :

- 10 - Particules sphériques isodisperses,
- Particules possédant une charge inorganique répartie de manière homogène dans le cœur,
- Particules de taille intermédiaire, à savoir ayant un diamètre compris entre 50 et 1000 nm,
- 15 - Particules fonctionnalisées ou fonctionnalisables,
- La charge inorganique peut être magnétique ou magnétisable,
- Particules obtenues par un procédé de synthèse simple et contrôlable.

20 Les particules composites de l'invention comprennent un cœur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, ledit polymère hydrophobe constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière homogène, lesdites particules étant au moins partiellement entourées par un  
25 copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée sur ou dans ladite matrice polymère.

Selon une variante de l'invention, les particules sont complètement entourées par le copolymère amphiphile et/ou la totalité de la partie  
30 hydrophobe du copolymère amphiphile est immobilisée sur ou dans la matrice polymère.

On comprend selon l'invention un copolymère amphiphile, comme un copolymère possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile, étant entendu que la partie hydrophobe et/ou la partie hydrophile peuvent être un ensemble de sous-parties respectivement hydrophobes et/ou hydrophiles  
5 constitutives du copolymère amphiphile. Ainsi, un copolymère amphiphile de l'invention est notamment choisi parmi les copolymères en blocs, les copolymères séquencés, les polymères ramifiés dont le squelette est hydrophobe ou hydrophile et les ramifications sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes, les polymères en peigne dont le squelette est hydrophobe ou  
10 hydrophile et les ramifications en peigne sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes.

La partie hydrophile du copolymère amphiphile peut être ionique, anionique ou cationique, ou non ionique ; elle comporte des groupements fonctionnels qui sont réactifs, directement ou indirectement.

15 Selon l'invention, la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée sur ou dans la matrice polymère. L'immobilisation de cette partie hydrophobe est toujours au moins de nature physique, et plus précisément mécanique, du type emprisonnement, et peut venir compléter une fixation préalable de la partie hydrophobe, de nature chimique ou physique comme  
20 une fixation par adsorption, par exemple. Ainsi, une immobilisation peut résulter des événements suivants :

- La partie hydrophobe du copolymère amphiphile est adsorbée à la surface de la matrice, puis définitivement immobilisée dans la matrice par le polymère hydrophobe ;
  - 25 - Ladite partie hydrophobe est solubilisée dans la phase organique, puis emprisonnée dans le polymère hydrophobe lors de la formation de la matrice ;
  - Ladite partie hydrophobe est uniquement emprisonnée mécaniquement lors de la formation de la matrice polymère.
- 30

Cette immobilisation conduit à des particules possédant une forte stabilité, et notamment bien supérieure à celle des particules connues décrites précédemment.

Un copolymère amphiphile approprié comprend avantageusement :

- 5 - Une partie hydrophobe choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras, et/ou
- Une partie hydrophile choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides, les polysaccharides.

Les matériaux inorganiques constituant les nanoparticules sont choisis parmi les oxydes métalliques, tels que les oxydes de fer, de titane, de chrome, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel et en particulier parmi les oxydes métalliques magnétisables, tels que les oxydes de  
15 fer, la magnétite, l'hématite ; les ferrites telles que les ferrites de manganèse, de nickel, de manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, de nickel.

Avantageusement, les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques magnétisables, préférentiellement les oxydes de fer.

Les nanoparticules inorganiques représentent 5 à 95%, de  
20 préférence 10 à 90% et avantageusement 20 à 90% en masse par rapport à la masse totale de la particule composite, de préférence 25 à 85%.

A l'intérieur des particules de l'invention, les nanoparticules sont stabilisées par des agents de stabilisation choisis parmi les chaînes polymère amphiphiles, les agents tensioactifs ioniques ou non ioniques, fonctionnels ou  
25 non fonctionnels, polymérisables ou non polymérisables. Les agents tensioactifs fonctionnels sont en particulier choisis parmi les acides gras ou des dérivés d'acides gras, en particulier l'acide oléique ou ses dérivés, et les mélanges d'agents tensioactifs tels que définis précédemment.

Les polymères hydrophobes appropriés de la matrice sont les  
30 polymères de type vinylaromatique hydrophobe, c'est à dire les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène,

ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres co-monomères, tels que les acrylates et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques. Préférentiellement, le polymère est un polymère réticulé. Ceci est obtenu en ajoutant dans le ou les monomères une faible quantité (inférieure à 10% en poids) de molécules ayant au moins deux doubles liaisons réactives, telles que le divinyl benzène, le méthacrylate de vinyle, le cyanurate de triallyle, le diacrylate de mono ou de polyéthylèneglycol.

Les particules composites de l'invention peuvent également inclure un marqueur, tel qu'un marqueur radioactif, étant entendu que le marqueur est introduit lors de la préparation de l'émulsion telle que décrite dans l'exemple 1 qui suit.

Les particules de l'invention présentent un diamètre de l'ordre d'environ 50 à 1000 nm, de préférence d'environ 100 à 500 nm, et avantageusement d'environ 100 à 250 nm. Ce diamètre est défini à plus ou moins environ 5%, ce qui signifie que leur diamètre moyen en volume est défini à plus ou moins environ 5% près.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des particules composites précitées qui permet d'obtenir directement des particules de diamètre souhaité et isodisperses sans nécessiter d'étape de tri en fonction du diamètre.

Selon un premier procédé de l'invention, on obtient des particules composites pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée dans la matrice polymère, comme suit :

(i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;



(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

(iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

5 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii), c'est-à-dire avant ou après l'étape (ii).

Selon un second procédé de l'invention, on obtient des particules composites pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est  
10 au moins partiellement immobilisée sur la matrice polymère, comme suit :

(i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B  
15 hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ;

(iii) on polymérise une fraction desdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

20 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii) ou après l'étape (iii), puis, lors d'une étape (iv), on polymérise la fraction restante des monomères hydrophobes à la surface de la matrice polymère. Quand le copolymère amphiphile est introduit avant l'étape (iii), il peut être introduit avant ou après  
25 l'étape (ii).

Pour obtenir les particules composites selon les procédés de l'invention, le polymère amphiphile est avantageusement choisi parmi ceux énoncés précédemment dans la description des particules composites.

Les monomères mis en œuvre doivent former des polymères  
30 hydrophobes. Ils sont insolubles dans la phase hydrophile et choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, amino-méthylstyrène, vinyltoluène. Ils sont utilisés seuls ou

en mélange ou bien encore en mélange avec d'autres monomères polymérisables insolubles dans l'eau tels que les acrylates, les méthacrylates d'alkyle, les esters d'acides éthyléniques et d'alkyle, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les acides éthyléniques, les composés diéniques.

5 Il est possible d'ajouter au monomère ou au mélange, de monomères un agent de réticulation hydrophobe, par exemple un monomère réticulant de type divinylbenzène, diméthacrylate, en particulier diméthacrylate de vinyle.

L'amorceur organosoluble est choisi parmi les amorceurs de type  
10 azobis, tels que les 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile), 2,2'-azobis(2-cyclopropylpropionitrile), 2,2'-azobis(2-méthylpropionitrile), 2,2'-azobis(2-méthylbutyronitrile), 1,1'-azobis(cyclohexane-1-carbonitrile), 1-((1-cyano-1-méthyléthyl)azo)formamide, 2-phénylazo-4-méthoxy-2,4-diméthyl-valéronitrile, diméthyl 2,2'-azobis(2-  
15 méthylpropionate, 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et 2,2'-azobis(2-(hydroxyméthyl)propionitrile). Si on choisit un amorceur hydrosoluble ou faiblement hydrosoluble, tels que les peroxydes, les hydroperoxydes et les persulfates, il engendre un début de polymérisation dans la phase hydrophile qui se propage dans la phase hydrophobe. Les persulfates, en particulier le  
20 persulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium sont solubles en phase aqueuse. Sous l'action de la chaleur, ils se décomposent et génèrent des anions à radicaux sulfate qui contribueront à charger la nanosphère composite. Le peroxyde d'hydrogène est soluble en phase aqueuse et génère des radicaux hydroxyles non chargés. La  
25 décomposition des hydroperoxydes génère un hydroxyle et un radical oxygéné qui se partageront dans une des phases en fonction de la nature du peroxyde utilisé. Ainsi, le peroxyde de cumène, dans le cas de la polymérisation du styrène, est supposé se décomposer au niveau de l'interface entre la particules de monomères et l'eau, les radicaux hydroxyles entrent dans la  
30 phase aqueuse et les radicaux non polaires diffusent vers la particule. De la nature cationique ou anionique de l'amorceur dépendra le caractère cationique ou anionique de la particule et du conjugué résultant de l'invention.

L'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile et pénètre dans la phase hydrophobe (a) soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, (b) soit préalablement à l'étape d'introduction des monomères hydrophobes, (c) soit postérieurement à l'étape d'introduction  
5 desdits monomères hydrophobes.

Dans un mode de réalisation préféré, l'étape (iii), et éventuellement l'étape (iv) de polymérisation sont effectuées par élévation de la température jusqu'à environ 60 à 90°C, en particulier à une température de 70°C, en présence de l'amorceur de polymérisation, étant entendu que les conditions de  
10 la polymérisation seront déterminées par l'homme du métier en fonction de la nature de l'amorceur retenu, ou par photochimie à l'aide de rayonnements, par exemple de rayonnements ultra violets ou d'un faisceau laser ou d'autres sources d'énergie.

La phase organique est une phase comprenant un hydrocarbure  
15 aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges ou une phase comprenant tout ou partie d'un composé organique polymérisable par voie radicalaire. De préférence, l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane et le  
20 dodécane, et le composé organique polymérisable par voie radicalaire est choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, étant entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier d'adapter les conditions de polymérisation en  
25 fonction du choix du ou des hydrocarbure(s) retenu(s) et de la nature de l'amorceur choisi. En particulier, si la polymérisation est effectuée par élévation de la température ou engendre une élévation de température, le montage réactionnel devra être adapté aux solvants volatils, tels que le pentane.

De manière préférentielle la phase hydrophile est une phase  
30 aqueuse, telle que de l'eau.

Dans des modes de réalisation préférentiels de la présente invention, la fonctionnalisation des particules peut être complétée par

introduction dans la phase B et pénétration dans la phase A de groupements réactifs fonctionnels. Les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par exemple par des monomères faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes de la matrice polymère. En particulier, les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par des monomères hydrophiles choisis parmi les monomères des acides acryliques, méthacryliques, éthyléniques et sulfoniques, seuls ou en mélange, ou encore en mélange avec des monomères hydrophobes ; étant entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier de déterminer la composition du mélange. Les groupements fonctionnels permettent les réactions ultérieures mais apportent également la stabilisation colloïdale nécessaire pour les applications ultérieures. Les groupements fonctionnels sont introduits dans la phase B et pénètrent à l'intérieur de la phase A (a) soit de manière simultanée à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii), (b) soit préalablement à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii), (c) soit postérieurement à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii).

Dans un mode de réalisation particulier, et si souhaité, l'étape (iii) est suivie d'une étape d'évaporation partielle ou totale de la phase organique A avec formation de particules composites poreuses.

L'invention fournit donc des particules composites qui sont fonctionnalisées par la partie hydrophile du copolymère amphiphile, et qui peuvent au surplus l'être par la présence, de groupements fonctionnels réactifs, apportés comme indiqué ci-dessus au cours du procédé de préparation. Les particules de l'invention sont fonctionnalisées de préférence par des groupements choisis parmi les groupements carboxylique, amine, thiol, hydroxyl, tosyl hydrazine, qui seront à même de réagir avec au moins un ligand.

Les particules composites fonctionnalisées, non poreuses ou poreuses, ainsi formées seront susceptibles d'immobiliser un ligand, par exemple une molécule biologique, telle qu'un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, une sonde, une amorce, un fragment d'acide nucléique ; des molécules chimiques,

telles que des polymères chimiques, des substances médicamenteuses, des molécules cages, des agents chélatants, des catalyseurs, la biotine ; étant entendu que lorsque les particules composites sont dites « poreuses », elles ont atteints un degré de porosité déterminé par évaporation totale ou partielle de la phase organique.

Aussi, la présente invention a également pour objet des conjugués constitué par des particules composites de l'invention dont les groupements réactionnels ont réagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand tel que défini ci-dessus, ainsi que leurs utilisations.

A titre d'exemple, lesdits conjugués sont utilisés dans des tests immunologiques pour la détection et/ou la quantification de protéines, d'antigènes, d'anticorps dans un échantillon biologique ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la quantification d'un fragment d'acide nucléique dans un échantillon biologique. L'utilisation de sondes pour la détection et/ou la quantification d'un acide nucléique dans un échantillon est bien connue de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration la technique d'hybridation sandwich. De même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés comme « agents porteurs d'amorces » pour une réaction d'amplification d'acides nucléiques dans un échantillon, par exemple par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou toute autre technique d'amplification appropriée, permettant ainsi la détection et/ou la quantification d'acides nucléiques dans l'échantillon biologique.

La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostique comprenant en outre lesdits conjugués et l'utilisation dudit réactif dans un essai diagnostique.

Les conjugués trouvent également une application dans le domaine thérapeutique comme véhicule ou vecteur d'une substance médicamenteuse, d'un agent réparateur de gènes défectueux, d'un agent susceptible de bloquer l'expression d'un gène, tel qu'une sonde anti-sens en thérapie ou d'un agent susceptible de bloquer l'activité d'une protéine et de ce fait ils peuvent être utilisés dans une composition thérapeutique ou prophylactique.

Ainsi, les conjugués de l'invention sont susceptibles de véhiculer une substance médicamenteuse dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend ledit conjugué en association avec un adjuvant et/ou diluant et/ou excipient approprié et pharmaceutiquement acceptable, ladite substance médicamenteuse étant capable d'être relarguée *in vivo*. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co.

Les conjugués de l'invention sont également susceptibles de véhiculer un gène d'intérêt thérapeutique codant pour au moins une protéine d'intérêt ou un fragment d'une protéine d'intérêt, étant entendu que par protéine on entend à la fois une protéine dans sa définition la plus généralement utilisée et un anticorps. Bien entendu, un tel conjugué est incorporé dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend également les éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique.

Les conjugués de l'invention sont également utilisables, quand incorporés dans une composition thérapeutique ou prophylactique, pour le transfert *in vivo* de sondes ou oligonucléotides anti-sens. Les anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand

sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un conjugué vecteur d'un oligonucléotide anti-sens tel que définis ci-dessus.

Enfin, les conjugués sont susceptibles de former des complexes du type molécule cage/cryptate, chélatant/molécule chélatée ou de servir de véhicule pour des catalyseurs dans une application chimique.

Les particules composites de l'invention sont obtenues par polymérisation en émulsion *in situ* selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent.

20

#### Exemple 1 : préparation d'une émulsion stable et isodisperse

Une émulsion de départ stable et isodisperse a été préparée conformément à l'un ou l'autre des protocoles décrits dans cet exemple.

(i) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé d'émulsification en incorporant progressivement, tout en cisillant à l'aide d'un moulin colloïdal (Ika : nom commercial), la phase dispersée, formée de 45% en poids d'oxydes de fer dans de l'octane, à la phase continue formée de dodécyl sulfate de sodium à une concentration de 50% en poids dans l'eau jusqu'à l'obtention de fractions comprenant de 80% en poids de ferrofluide organique. Le mélange ainsi défini a été fragmenté dans une couette de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement déterminé. L'émulsion primaire ainsi

préparée est une émulsion polydisperse caractérisée par une distribution large du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

(ii) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé  
5 d'émulsification en ajoutant rapidement la phase dispersée, formée d'octane, de 73% en poids d'oxydes de fer et d'un agent tensioactif lipophile de type monoglycérol ou polyglycérol de polyrisinoléate (1 à 10% en poids), à la phase continue formée de tensioactif de type tergitol NP10 (31% en poids) grâce à une spatule. Le mélange ainsi défini est ensuite fragmenté dans une couette  
10 de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement défini. L'émulsion primaire ainsi préparée est une émulsion relativement isodisperse caractérisée par une distribution faible du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

15

### **Exemple 2 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne »**

L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ; Ts = 5%) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à  
20 trois reprises par séparation magnétique avec une solution de polymère (1,5 g/l ; pH8). A chaque lavage, le surnageant limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Le copolymère amphiphile est un polyacide acrylique modifié par des chaînons hydrophobes (Mw = 20 000 g/mol). Ce polymère est composé par 90% de motifs acide  
25 acrylique et par 10% de motifs méthacrylate de polyoxyalkylène / aryle (Coatex JS3879B). Le copolymère possède des propriétés amphiphiles qui permettent de venir s'adsorber aux interfaces eau - huile. Après avoir été filtrée sur un filtre nylon de 1  $\mu$ m, l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le  
30 styrène (0,3 g) dans lequel est dissous le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (4 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble



est laissé sous agitation (200 tours/min) et à la température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 15 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 3 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc**

L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ; Ts = 5%) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à trois reprises par séparation magnétique avec la solution de copolymère précédente (0,8 g/l, pH8). Ce copolymère a été obtenu selon un procédé de polymérisation par voie radicalaire contrôlée. Il possède une masse d'environ 20 000 g/mol. Le bloc polystyrène représente environ 10% de la masse du polymère. A chaque lavage, le surnageant limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Après avoir été filtré sur un filtre nylon de 1 µm, l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le styrène (0,3 g) et le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (6 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble est laissé sous agitation (200 tours/min) et à température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 15 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 4 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc**

L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ;  $T_s = 5\%$ ) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à deux reprises par séparation magnétique avec la solution de copolymère précédente (0,4 g/l ; pH8). Le bloc polyacide acrylique a été obtenu par polymérisation radicalaire contrôlée. Le polymère possède une masse de 18 600 g/mol et le bloc polyéthylène représente environ 2% de cette masse. A chaque lavage, le surnageant limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Après avoir été filtré sur un filtre nylon de 1  $\mu\text{m}$ , l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le styrène (0,3 g) et le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (6 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble est laissé sous agitation (200 tours/min) et à température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 14 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 5 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne », dont la partie hydrophobe est immobilisée à la surface de la matrice polymère**

**(i) Obtention du latex**

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole de l'exemple 1(i) et constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 180 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et un mélange de tensioactifs (dodécyl sulfate de sodium (SDS) et acide oléique), dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 1%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 7 heures à l'azote. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation,

solubilisé dans l'hexane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans l'émulsion. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant une heure et 80 mg de monomères de styrène sont ensuite introduits. Les monomères de styrène diffusent à l'intérieur de la phase A pendant deux heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures trente minutes, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 188 nm et un indice de polydispersité de l'ordre de 1,1.

**(ii) Immobilisation du copolymère amphiphile**

Des particules de latex magnétiques polystyrène obtenus en (i) (45 ml) sont lavées deux fois avec une solution de polymère Coatex (PM = 20 000 g/mol ; 0,8 g/l ; pH3,4) par des séparations magnétiques successives. Le latex ainsi lavé est introduit (44 ml ; Ts = 3,8%) dans le réacteur de polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé deux heures par l'azote sous agitation (200 tours/min). On introduit le styrène (0,3 g) et on laisse gonfler pendant une heure sous agitation à 200 tours/min. On élève la température à 70°C puis on introduit du persulfate de potassium (KPS) (6 mg dans 1 ml d'eau milliQ). Puis on polymérise à 70°C pendant 7 heures sous agitation à 200 tours/min.

**Exemple 6 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc, dont la partie hydrophobe est immobilisée à la surface de la matrice polymère**

Des particules de latex magnétique polystyrène (45 ml obtenus par polymérisation in situ d'une émulsion avec un mélange classique styrène / amorceur non hydrosoluble, conformément à l'Exemple 5 (i)) sont lavées deux fois avec une solution de polymère dibloc (PM = 10 000 g/mol ; 0,8 g/l ; pH = 3,4) par des séparations magnétiques successives. Le latex ainsi lavé est introduit (40 ml ; Ts = 3,4%) dans le réacteur de polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé deux heures par l'azote sous agitation (200 tours/min). On introduit le styrène (0,3 g) et on laisse gonfler pendant une

heure sous agitation à 200 tours/min. On élève la température à 70°C puis on introduit du persulfate de potassium (KPS) (4 mg dans 0,2 ml d'eau milliQ). Puis on polymérise à 70°C pendant 16 heures sous agitation à 200 tours/min.

5                   **Exemple 7 : Préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne »**

L'émulsion magnétique préparée comme indiqué dans l'exemple 1(i) (diamètre 220nm et de concentration 4% masse/volume) est stabilisée avec un copolymère amphiphile en peigne polyacide acrylique modifié par des  
10   chaînon hydrophobes (PM = 50000 g/mol), constitué par 80% de motifs acide acrylique et 20% de motifs méthacrylate de polyoxyalkylène/aryle (Coatex M883 ), à une concentration de 0,05%, et placée dans un réacteur de polymérisation. Six mg d'AIBN (2,2'-azobisisobutyronitrile), 360 mg de styrène et 240 mg de divinylbenzène sont ajoutés et incubés pendant 1 heure à 20°C.  
15   La polymérisation est engendrée par élévation de la température à 70°C pendant 13 heures. Le latex magnétique final a une taille de l'ordre de 240 nm.

**Exemple 8 : Préparation de particules composites**

L'émulsion magnétique telle que préparée dans l'exemple 1(i) est  
20   stabilisée dans le Triton X-405 à 0.2%, puis est lavée à trois reprises avec une solution du polymère tel que décrit dans l'exemple 7 (Coatex M883 ; PM = 50000 g/mol) à une concentration de 0.05%.

**Exemple 9 : Greffage de la streptavidine**

25                   On a ajouté 100 µl de tampon phosphate (10 mM, pH 6.8) dans 0.5 mg des particules telles qu'obtenues dans les exemples 7 et 8 précédents. On a agité puis aimanté les particules. On a repris les particules dans 50 µl de tampon phosphate. Dans un tube Eppendorf, on a mélangé 15 µl de streptavidine (5mg/ml) avec 50 µl de carbodiimide hydrosoluble (1mg/ml). On a  
30   agité 2 minutes à 300 tour/min puis on a ajouté les particules dans le tube. On a incubé à 40°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes puis on a ajouté 100 µl

de tampon de blocage (PBS+Triton X-405+ éthanolamine). On a incubé à 40°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a alors aimanté les particules puis on les a reprises dans 100 µl de tampon de stockage (PBS+Triton X-405). On a effectué deux nouveaux lavages avec le tampon de stockage. Lors d'un  
5 dernier lavage, on a repris les particules dans 50 µl de tampon de stockage.

#### **Exemple 10 : Greffage d'un oligonucléotide biotinylé sur le conjugué particule-streptavidine**

On a aimanté les particules de 0.25 mg des conjugués tels qu'obtenus dans l'exemple 9 précédent et on les a reprises dans 50 µl de  
10 tampon TE NaCl (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 1M, Triton X-405 0.05%, ADN de saumon). On a ajouté  $2,2 \cdot 10^{13}$  copies d'oligonucléotide (ODN) biotinylé. On a incubé à 37°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a aimanté les particules et on les a reprises dans 50 µl de tampon TE NaCl.

15

#### **Exemple 11 : Hybridation et révélation du couplage**

On a ajouté 100 µl de tampon TE NaCl à 40 µg des conjugués tels qu'obtenus dans l'exemple 10 précédent. On a ajouté  $18 \cdot 10^{10}$  copies d'oligonucléotide cible et  $18 \cdot 10^{10}$  copies d'oligonucléotide de détection marqué  
20 par de la peroxydase de raifort. On a incubé à 37°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a lavé à trois reprises dans le tampon TE NaCl. On a ajouté 100 µl d'o-phénylènediamine (OPD) (dilution de 5mg d'OPD dans 2,5 ml de diluant Coloreia). On a incubé pendant 3 minutes. On a ajouter 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, puis on a aimanté les particules. On a prélevé 100 µl de surnageant  
25 et on a analysé son intensité à 492 nm. Le témoin négatif est composé de conjugués sans cible. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

	témoin négatif	Test-1	Test-2
Conjugués de l'exemple 8	0,266	0,848	0,871
Conjugués de l'exemple 9	0,242	0,822	0,824

## REVENDEICATIONS

1. Particules composites comprenant un cœur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, ledit polymère hydrophobe  
5 constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière homogène, lesdites particules étant caractérisées en ce qu'elles sont au moins partiellement entourées par un copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiellement  
10 immobilisée sur ou dans ladite matrice polymère.

2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont complètement entourées par un copolymère amphiphile.

3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que la totalité de la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est immobilisée  
15 sur ou dans la matrice polymère.

4. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras.

20 5. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que la partie hydrophile du copolymère amphiphile est choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides les polysaccharides.

6. Particules selon les revendications 4 et 5, caractérisées en ce  
25 que le copolymère amphiphile est choisi parmi les polymères en bloc, les polymères séquencés, les polymères ramifiés, les polymères en peigne.

7. Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles présentent des groupements fonctionnels réactifs à leur surface, tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine,  
30 susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

8. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les nanoparticules sont constituées de matériaux inorganiques choisis parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel ; la magnétite ; l'hématite ; les ferrites telles que les  
5 ferrites de manganèse, de nickel, de manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, de nickel.

9. Particules selon la revendication 8, caractérisées en ce que les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques magnétisables, tels que l'oxyde de fer, la magnétite et l'hématite.

10 10. Particules selon la revendication 8 ou 9, caractérisées en ce que les matériaux inorganiques représentent de 5 à 95%, de préférence de 10 à 90%, de manière encore plus préférée de 20 à 90%, et avantageusement de 25 à 85% en masse par rapport à la masse totale desdites particules.

11. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les  
15 nanoparticules inorganiques sont stabilisées par des agents de stabilisation choisis parmi les groupements ioniques, les chaînes polymère, les agents tensioactifs, les agents tensioactifs fonctionnels, tels que les acides gras ou les dérivés d'acides gras, et les mélanges d'agents tensioactifs.

12. Particules selon la revendication 11, caractérisées en ce que  
20 les agents tensioactifs sont choisis parmi le dodécyl sulfate de sodium et les mélanges de dodécyl sulfate de sodium et d'acide oléique.

13. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que la matrice polymère est une matrice de type polymère vinylaromatique hydrophobe choisie parmi les homopolymères de monomères  
25 vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides  
30 éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

14. Particules selon la revendication 13, caractérisées en ce que le polymère est un polymère réticulé.

15. Particules selon les revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent de plus un marqueur radioactif.

5 16. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisées en ce qu'elles présentent un diamètre de l'ordre de 50 à 1000 nm, de préférence d'environ 100 à 500 nm et avantageusement d'environ 100 à 250 nm.

10 17. Procédé de préparation de particules composites selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et pour laquelle la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée dans la matrice polymère, caractérisé en ce que

(i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée  
15 de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

20 (iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

ledit procédé étant caractérisé en ce que, avant l'étape (iii), on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile.

25 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on introduit le copolymère amphiphile avant ou après l'étape (ii).

19. Procédé de préparation de particules composites selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et pour laquelle la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée sur la matrice polymère, caractérisé en ce que

30 (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans



une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

5 (iii) on polymérise une fraction desdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

ledit procédé étant caractérisé en ce que, avant l'étape (iii) ou après l'étape (iii), on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, puis, selon une étape (iv), on polymérise la fraction  
10 restante des monomères hydrophobes à la surface de la matrice polymère.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que lorsqu'on introduit le copolymère amphiphile avant l'étape (iii), on l'introduit avant ou après l'étape (ii).

21. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que  
15 le copolymère amphiphile est choisi parmi les polymères en bloc, les polymères séquencés, les polymères ramifiés, les polymères en peigne.

22. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que les monomères hydrophobes sont choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-  
20 styrène, amino-méthylstyrène, vinyltoluène, seuls ou en mélange, ou bien encore en mélange avec d'autres monomères polymérisables insolubles dans l'eau tels que les acrylates, les méthacrylates d'alkyle, les esters d'acides éthyléniques et d'alkyle, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les acides éthyléniques, les composés diéniques.

23. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que  
25 on ajoute au monomère ou au mélange de monomères un agent de réticulation hydrophobe, tel qu'un monomère réticulant de type divinylbenzène, diméthacrylate, en particulier diméthacrylate de vinyle.

24. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que  
30 l'agent amorceur est choisi parmi les amorceurs organosolubles ou faiblement solubles dans la phase hydrophile, et les amorceurs solubles dans la phase hydrophile.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'agent amorceur organosoluble est choisi parmi amorceurs de type azobis, tels que les 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile), 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile), 2,2'-azobis(2-cyclopropylpropionitrile), 2,2'-azobis(2-méthylpropionitrile), 2,2'-azobis(2-méthylbutyronitrile), 1,1'-azobis (cyclohexane-1-carbonitrile), 1-((1-cyano-1-méthyléthyl)azo)formamide, 2-phénylazo-4-méthoxy-2,4-diméthyl-valéronitrile, diméthyl-2,2'-azobis(2-méthylpropionate, 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et 2,2'-azobis(2-(hydroxyméthyl)propionitrile) et l'amorceur faiblement soluble ou soluble dans la phase hydrophile est choisi parmi les amorceurs radicalaires de type peroxyde, tels que les peroxydes, les hydroperoxydes, en particulier l'hydroperoxyde de cumène, et les amorceurs de type persel, tels que les persulfates, en particulier le persulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium.

26. Procédé selon les revendications 17 ou 19 et 24 ou 25, caractérisé en ce que l'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, soit avant, soit après l'introduction desdits monomères.

27. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) et/ou (iv) est effectuée par chauffage jusqu'à une température de 60 à 90°C, de préférence de 70°C.

28. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) est effectuée par photochimie.

29. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la phase A est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges ou une phase comprenant tout ou partie d'un composé organique polymérisable par voie radicalaire choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane, le dodécane, et le composé organique polymérisable par voie radicalaire est choisi parmi le styène, le méthylstyène, l'éthylstyène, tertio-butyl-styène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux.

31. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la phase B est une phase aqueuse, telle que de l'eau.

32. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend de plus une étape de fonctionnalisation des particules composites par pénétration dans la phase A de groupements réactifs fonctionnels apportés par des monomères faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que les groupements réactifs fonctionnels sont des groupements acides apportés par des monomères faiblement hydrophiles choisis parmi les monomères des acides acryliques, méthacryliques, éthyléniques, sulfoniques et les monomères polymérisables choisis parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styène, méthylstyène, éthylstyène, tertio-butyl-styène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, seuls ou en mélange avec d'autres monomères hydrophobes.

34. Procédé selon les revendications 17 ou 19 et 32 ou 33, caractérisé en ce que lesdits monomères faiblement hydrophiles sont apportés dans la phase A, soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, soit avant, soit après l'introduction desdits monomères.

35. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend de plus après l'étape de polymérisation (iii), une étape d'évaporation totale ou partielle de la phase A.

36. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une

protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique et la biotine.

37. Réactif comprenant en outre au moins un conjugué tel que défini dans la revendication 36.

5           38. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs.

10           39. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand choisi parmi les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant  
15   une activité protéique.

40. Utilisation des conjugués tels que définis dans la revendication 39 dans une composition thérapeutique.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C08K9/08 C08F2/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08K C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 814 687 A (HAN KAKUN ET AL) 29 September 1998 (1998-09-29) column 17 -column 18; tables 2,3 claims 1-10	1-40
A	FR 2 503 728 A (DART IND INC) 15 October 1982 (1982-10-15) claims 1-10	1-40
A	EP 0 857 764 A (BAYER AG) 12 August 1998 (1998-08-12) claims 1-13	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2002

Date of mailing of the international search report

30/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siemens, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 02/01552

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5814687	A	29-09-1998	JP 9208788 A	12-08-1997
FR 2503728	A	15-10-1982	US 4375520 A	01-03-1983
			BE 892789 A1	02-08-1982
			DE 3211295 A1	04-11-1982
			FR 2503728 A1	15-10-1982
			GB 2096620 A , B	20-10-1982
EP 0857764	A	12-08-1998	DE 19704943 A1	13-08-1998
			AU 743076 B2	17-01-2002
			AU 5294498 A	13-08-1998
			BR 9800587 A	20-07-1999
			CA 2229086 A1	10-08-1998
			CN 1195006 A	07-10-1998
			EP 0857764 A2	12-08-1998
			JP 10231367 A	02-09-1998
			NZ 329710 A	29-06-1999
			US 6132505 A	17-10-2000

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 02/01552A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C08K9/08 C08F2/44

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08K C08F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 814 687 A (HAN KAKUN ET AL) 29 septembre 1998 (1998-09-29) colonne 17 -colonne 18; tableaux 2,3 revendications 1-10	1-40
A	FR 2 503 728 A (DART IND INC) 15 octobre 1982 (1982-10-15) revendications 1-10	1-40
A	EP 0 857 764 A (BAYER AG) 12 août 1998 (1998-08-12) revendications 1-13	1-40

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 août 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/08/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Siemens, T

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Internationale No  
 PCT/FR 02/01552

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5814687	A	29-09-1998	JP 9208788 A	12-08-1997
FR 2503728	A	15-10-1982	US 4375520 A	01-03-1983
			BE 892789 A1	02-08-1982
			DE 3211295 A1	04-11-1982
			FR 2503728 A1	15-10-1982
			GB 2096620 A , B	20-10-1982
EP 0857764	A	12-08-1998	DE 19704943 A1	13-08-1998
			AU 743076 B2	17-01-2002
			AU 5294498 A	13-08-1998
			BR 9800587 A	20-07-1999
			CA 2229086 A1	10-08-1998
			CN 1195006 A	07-10-1998
			EP 0857764 A2	12-08-1998
			JP 10231367 A	02-09-1998
			NZ 329710 A	29-06-1999
			US 6132505 A	17-10-2000



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**